



[translation]

(19) Korean Intellectual Property Office (KR)
(12) Registered Patent Publication (B1)

(45) Publication Date: March 21, 2002
(11) Registration Number: 10-0315200
(24) Registration Date: November 7, 2001

(21) Application Number: 10-1998-48080
(22) Filing Date: November 10, 1998

(65) Laid-open Number: Patent 2000-31849
(43) Laid-open Date: June 5, 2000

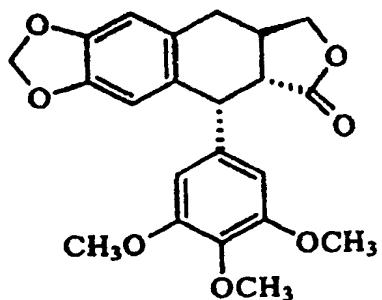
(73) Patentee: KIM, Song-Bae
(72) Inventors: KIM, Song-Bae
 AHN, Byoung-Joon
 KIM, Yong

(54) Title: Composition for treatment of solid cancer containing deoxypodophyllotoxin as an active ingredient

[Abstract]

The present invention relates to a composition for inhibiting angiogenesis containing deoxypodophyllotoxin represented by the following formula (1) as an active ingredient and to a process for inhibiting angiogenesis by using the same.

Formula (1)



(57) Claims

1. A composition for treatment of solid cancer containing deoxypodophyllotoxin as an active ingredient.
2. The composition of claim1 wherein the deoxypodophyllotoxin is separated from *Anthriscus sylvestris*.
3. The composition of claim1 wherein the deoxypodophyllotoxin is administered by 60-300mg/day.
4. A process for treatment of solid cancer by inhibiting angiogenesis of animal except for human, comprising administering deoxypodophyllotoxin thereto.
5. The process of claim 4 wherein the deoxypodophyllotoxin is separated from *Anthriscus sylvestris*.
6. The process of claim 4 wherein the deoxypodophyllotoxin is administered by 60-300mg/day.

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl. ⁶ A61K 31/335 A61K 31/34	(45) 공고일자 2002년 03월 21일 (11) 등록번호 10-0315200 (24) 등록일자 2001년 11월 07일
(21) 출원번호 10-1998-0048080 (22) 출원일자 1998년 11월 10일	(65) 공개번호 특 2000-0031849 (43) 공개일자 2000년 06월 05일
(73) 특허권자 김송배 충남 공주시 반포면 봉곡리 533-2	
(72) 발명자 김송배 충남 공주시 반포면 봉곡리 533-2 안병준 대전광역시 유성구 신성동 152-1 두레아파트 106동 701호 김용 대전광역시 중구 선화1동 12-4번지 1동 5반	
(74) 대리인 김석중, 최규팔	

심사관 : 이유형

(54) 데옥시포도필로톡신을 유효성분으로 함유하는 고형 암 치료제 조성을

요약

본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 데옥시포도필로톡신(deoxypodophyllotoxin)을 유효성분으로 함유하는 혈관 신생 억제용 조성을 및 그를 이용한 혈관 신생 억제방법에 관한 것이다.

화학식 1

대표도

도 1

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 HUVEC 세포에 대한 데옥시포도필로톡신의 혈관 신생 억제 실험 결과를 나타내는 사진.

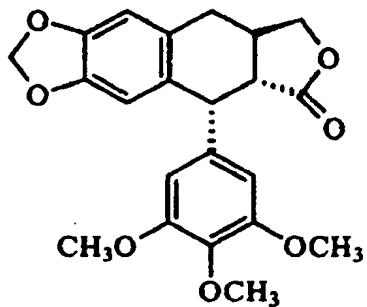
발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 데옥시포도필로톡신(deoxypodophyllotoxin)의 혈관 신생 억제제(antiangiogenic agents)로서의 신규한 용도에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 하기 화학식 1로 표시되는 데옥시포도필로톡신을 유효성분으로 함유하는 혈관 신생 억제용 조성을 및 그를 이용한 혈관 신생 억제방법에 관한 것이다.

[화학식 1]



혈관 신생(angiogenesis)은 혈관 내피세포로부터 혈관이 새로이 생성되는 것을 의미하는 것으로서, 상처, 염증, 고혈암 등 생체가 혈관 신생을 위한 자극을 받을 때 일어나는 생리현상이다.

혈관 신생으로 인하여 발생되는 질병은 혈관의 신생을 차단함으로써 치료될 수 있을 것이다. 특히 고혈암의 경우 암세포가 세포분열하여 암조직이 형성되기 위해서는 혈관의 신생을 필수적으로 필요로 하며 혈관을 통하여 암조직이 필요로 하는 물질을 공급받는다. 따라서 암조직의 혈관 생성을 차단함으로써 암의 생성을 예방할 있음을 물론, 생성된 암조직을 퇴화시킬 수 있을 것이다.

한편, 데옥시포도필로톡신은 전호(*Anthriscus sylvestris* Hoffmann)를 비롯하여, 쥬니페루스(*Juniperus*) 속 식물, 포도필럼(*Podophyllum*) 속 식물, 버세라 마이크로필라(*Bursera microphylla*), 리보세드루스 비디월리(*Libocedrus bidwillii*), 헤르난디아 오비게라(*Hernandia ovigera*) 등으로부터 분리된 바 있는 공지의 물질이다. 데옥시포도필로톡신의 효능에 대해서는 암세포주에 대하여 세포독성을 나타낸다는 보고가 있었으나 [문헌[A. San Feliciano 등, *Planta Medica* 59(1993), 247; Arch. Pharm. 327, 175(1994)], 문헌[D.B.M. Wickramaratne 등, *Planta Medica*, 61(1995), 80] 및 문헌[J. J. Chen 등, *Planta Medica* 62(1996), 528]], 몇 가지 세포주에 대한 세포독성의 측정에 한정되어 있었다.

더욱이 세포독성의 작용기전으로는 세포분열 독성[문헌[R.S. Gupta; *Cancer Research* 43, 505-512(1983)] 및 문헌[J.D. Loike 등; *Cancer Research* 38, 2688-2693(1978)]) 및 DNA 토포이소머라제(topoisomerase) II의 저해 등으로 보고되어 있었다.

따라서, 현재까지 동물 실험 등을 통한 데옥시포도필로톡신의 혈관 신생 억제제로서의 유용성에 대해서는 전혀 밝혀진 바 없었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 공지의 물질인 데옥시포도필로톡신의 혈관 신생 억제제로서의 신규한 용도를 제공하기 위한 것으로서, 데옥시포도필로톡신을 유효성분으로 함유하는 혈관 신생 억제용 조성물 및 그를 이용한 혈관 신생 억제방법을 제공하기 위한 것이다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 데옥시포도필로톡신을 유효성분으로 함유하는 혈관 신생 억제용 조성물을 제공한다. 데옥시포도필로톡신은 전호로부터 분리되는 것을 사용할 수 있으며, 데옥시포도필로톡신이 60~300mg/일로 투여되도록 하는 것이 바람직하다.

본 발명은 또한 데옥시포도필로톡신을 투여하는 단계를 포함하는 혈관 신생 억제 방법을 제공한다. 상기 방법에서, 데옥시포도필로톡신은 전호로부터 분리되는 것을 사용할 수 있으며, 데옥시포도필로톡신을 60~300mg/일로 투여하는 것이 바람직하다.

이하, 본 발명을 상세히 설명하면 하기와 같다.

본 발명자들은 고혈암의 조직화 기전을 기초로 하여, 일련의 식물을 대상으로 혈관 신생 억제제를 스크리닝하였던 바, 전호 등 수종의 생약 추출물이 혈관 신생을 강력히 억제함을 발견하였다.

즉, 전호의 뿌리를 용매 추출하여 혈관 신생 억제작용을 측정한 결과, 헥산 추출물이 강력한 혈관 신생 억제작용을 나타냄을 확인하였다. 이에 따라 그 헥산 추출물을 실리카겔 월럼 크로마토그래피하여 분획들을 수득한 후 이들의 혈관 신생 억제 작용을 측정하여 작용 분획을 찾아내고 이 분획으로부터 물질을 분리하여 그 구조를 결정하였다. 실험 결과를 상술하면 하기와 같다.

· 수율 : 290mg/kg

· m.p. : 169~170°C

· 분자량 : 398

· 분자식 : C₂₂H₂₂O₇

(분자량 및 분자식은 고성능 질량분석법(high mass spectrometry)로 측정하였다)

· C¹³ 및 H 핵자기 공명 스펙트럼 데이터: 하기 표 1에 나타내었다.

[표 1]

전호로부터 분리한 물질의 C^{13} 및 H 핵자기공명 스펙트럼 데이터

탄소	화학적 이동(ppm)	프로톤	화학적 이동(ppm)	커플링 상수(Hz)
C-1	33.13	H1	4.60	$J_{H_{1,2}}$ 3.2
C-2	47.52	H2	3.06	
C-3	43.75	H3	1.77	
C-4	32.77	$H4 \alpha \beta$	2.68	$J_{H_{1,2}}$
C-4a	128.29	$H5 \beta$	6.67	
C-5	108.40	H8	6.52	
C-6	147.06	$H11 \alpha$	4.45	$J_{H_{11\alpha}, \beta}$ 8.57
C-7	146.77	$H11 \beta$	3.91	$J_{H_{11\alpha}, 3}$
C-8	110.48	$H12 \alpha \beta$	5.94	
C-8a	130.67	$H2', 6'$	6.35	
C-9	174.88	$OMe(C4')$	3.81	$J_{H_{12\alpha}, \beta}$
C-10	72.04	$OMe(C3', 5')$	3.75	
C-11	101.18			
C-1'	137.18			
C-2', -6'	108.47			
C-3', -5'	152.55			
C-4'	136.25			
3', -5' -OMe	26.26			
4' -OMe	60.74			

상기 결과들로부터 본 발명자들은 그 물질이 공지의 물질인 데옥시포도필로톡신에 해당된다는 놀라운 사실을 발견하였다.

본 발명에서는, 데옥시포도필로톡신이 1.0ng/ml 농도에서 HUVEC 세포(내피세포(endothelial cell))의 혈관 신생을 100% 억제한다는 사실을 확인하였다.

또한 편 A549 세포 및 P388 세포에 대하여 ED₅₀값이 각각 5.0ng/ml과 4.0ng/ml의 우수한 세포독성을 나타낸다. 그러나 혈관 신생 억제 농도인 1.0ng/ml에서는 이를 두 세포에 대하여 세포독성을 나타내지 않는 것으로 밝혀졌다. 결국 데옥시포도필로톡신의 혈관신생 억제작용과 암세포에 대한 세포독성간의 차이는 양적인 문제임을 확인하였다. 따라서 데옥시포도필로톡신은 그 투여량을 조절함으로써 혈관 신생 억제와 세포독성을 순차적으로 일으키게 할 수 있으므로 항암제로서의 이용가치도 높은 것으로 평가된다.

또한 본 발명에서는 B16F10 세포를 이식한 BDF1 마우스, 인체 대장암세포주 HT-29 및 인체 폐암세포주 NCI-H123을 이식한 누드 마우스를 대상으로 데옥시포도필로톡신의 항암효과를 실험한 결과, 형성된 암괴가 현저히 감소됨을 확인할 수 있었다. 따라서 데옥시포도필로톡신이 혈관 신생을 억제하는 작용을 함으로써 암조직의 형성을 억제함으로써 항암 효과를 나타낸다는 사실을 알 수 있다.

한편 순수한 혈관 신생 억제제는 그 자체만으로 암을 완전 치유하는데는 한계가 있는 바, 그것은 혈관 신생을 억제하여 암조직의 형성을 저해한다 하여도 암세포 자체를 소멸시킬 수는 없기 때문이다. 즉 혈관 신생 억제를 통하여 대다수의 암세포가 소멸되더라도, 국소의 비조직성 암세포는 생존하게 되고, 따라서 이 경우에는 신생 혈관 신생 억제제와 함께 세포독성 물질을 투여함으로써 항암제로서의 가치를 높일 수 있을 것으로 기대된다.

데옥시포도필로톡신의 인체에 대한 유효 용량은 하기하는 실시예의 결과를 기초로 하여 1일 60~300mg일 것으로 추정된다. 본 발명에서는 데옥시포도필로톡신을 유효성분으로 함유하는 혈관 신생 억제용 조성물을 제공하는 바, 데옥시포도필로톡신은 약제학적 분야에서 통상적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 약제학적 분야에서 통상적인 제제, 예를 들면 정제, 칼셀제, 트로치제, 액제, 혼탁제 등의 경구투여용 제제, 주사용 용액 또는 혼탁액, 또는 주사시 주사용 종류수로 재조제하여 사용할 수 있는 즉시 사용형 주사용 건조분말 등의 형태의 주사용 제제, 연고제, 크림제, 액제 등의 국소적용형 제제 등, 다양한 제제로 제형화시킬 수 있다. 본 발명의 조성물에서 사용될 수 있는 담체로는 약제학적 분야에서 통상적인 것으로, 예를 들면 경구투여용 제제의 경우, 결합제, 활택제, 통해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 혼탁화제, 색소 또는 향료 등이 있으며, 주사제의 경우 보존제, 무통화제, 가용화제 또는 안정화제 등이 있고, 국소투여용 제제의 경우 기제, 부형제, 윤활제 또는 보존제 등이 있다. 이렇게 제조된 약제학적 제제는 경구적으로 투여되거나, 비경구적으로, 예를 들면 정액내, 피하, 복강내 투여 또는 국소적용될 수 있다. 또한 경구투여시에 약제가 위산에 의해 분해되는 것을 방지하기 위하여 제산제를 병용하거나, 정제 등의 경구투여용 고형 제제를 장용피로 피복된 제제로 제형화하여 투여할 수 있다.

[실시예]

이하, 본 발명을 바람직한 실시예에 의거 보다 상세히 설명하나, 이는 발명의 구성 및 작용의 이해를 돋기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위를 제한하고자 하는 것은 아니다.

【실시예 1】 혈관 신생 억제실험

-20°C의 냉동고에서 보관하였다가 사용시에 4°C에서 하룻밤 방치하여 서서히 용해시킨 매트리겔(Matrigel)을 크리오 투브(cryo tube)에 1㎖씩 분주한 후 4°C에서 보관하여 준비하였다. 또한 HUVEC 세포 서브컬처시 사용하는 트립신-EDTA를 HBSS로 희석하여 원액을 10배 희석한 희석액을 조제하였다.

M199(Gibco BRL 31100-350) 1봉과 중탄산나트륨 2.2g을 종류수 1ℓ에 용해시킨 다음 pH 7.2로 조정하여 M199 배지를 조제하였으며, bFGF(Gibco BRL 13256-029) 10㎍을 멀균종류수 100㎕에 용해시킨 후 1회 사용에 적당한 양을 분주하여 두었다. 또한 100,000유닛(175유닛/mg)의 해파린(Gibco BRL 15077-019) 571mg를 멀균한 M199 배지 5.7㎖에 용해시켰다. 상기 M199 배지 240㎖, bFGF 9㎕, 해파린 300㎕를 FBS 60㎖에 가하여 하루동안 오염여부를 확인한 후 PS 3㎖를 첨가하여 M199/CM 300㎖를 제조하여 사용하였다. 한편 시판 시약인 2% 젤라틴을 3차 종류수로 0.3%로 희석하여 멀균하고 이것을 T75 배양 플라스크에 1.5㎖로 바닥을 코팅하여 클린 벤취내의 평평한 곳에서 2시간 동안 방치한 후 냉장고에서 보관하였다.

상기에서 제조한 매트리겔을 24-월 플레이트에 1 월당 250㎕씩 거품이 생기지 않게 가한 후 플레이트를 37°C에서 30분 동안 배양하였다. 24-월 플레이트의 1 월당 4×10⁵ 세포의 HUVEC 세포를 첨가한 후 즉시 대옥시포도필로톡신을 디메틸설포사이드(DMSO)에 용해시킨 용액을 가하였다. 이때 최종농도는 30, 10, 3, 1ng/ml 이 되도록 조정하였다. 양성 대조군으로는 PMA(40ng/ml)를 사용하였다. 상기 모든 실험은 빙욕 상에서 행하였다.

약물을 가한 후 1시간 간격으로 24시간 동안 그 HUVEC 세포의 혈관 신생 여부를 관찰하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다. 도 1에 있어서, 상부 사진은 양성 대조군의 결과를, 하부 사진은 1ng/ml의 대옥시포도필로톡신으로 처리한 경우의 결과를 각각 나타내는 것이다. 도 1로부터 1ng/ml의 대옥시포도필로톡신이 HUVEC 세포의 혈관 신생을 100% 억제하는 것을 알 수 있다.

【실시예 2】 대옥시포도필로톡신의 A549 세포에 대한 세포독성 실험

인체 폐암세포 A549 세포는 한국인상연초연구소에서 분양받아 사용하였다. 한편 멀균 주사용 종류수에 L-글루타메이트가 포함된 RPMI 1640 분말 1봉(Gibco Co.), 50°C 수조에서 30분간 가온하여 불활성화시킨 우테아 혈청(FBS) 100㎖, NaHCO₃ 2g, 페니실린 100,000단위, 스트렙토마이신 100mg를 가하여 용해시켰다. 이것을 0.1N 염산으로 pH를 7.2로 조절하여 전체를 1ℓ가 되게 한 다음 세균여과하여 배양액을 제조하였고, 4°C 냉장고에서 보관하면서 사용하였다. 세포의 계대는 4일에 1회 행하였으며, A549 세포를 부착면으로부터 분리하기 위하여 PBS 용액에 0.5% 트립신과 2% EDTA를 용해시킨 용액을 사용하였다.

A549 세포에 대한 세포독성은 1989년에 미국 국립 암연구소에서 약물의 인비트로 항암 활성도를 측정하기 위하여 개발된 살포로다민-B(sulforhodamine-B(SRB))법을 사용하였다. 즉 A549 세포들을 0.5% 트립신-EDTA 용액으로 부착면으로부터 분리시키고 3.0×10⁴ 세포/ml의 세포현탁액을 제조한 다음 96-월 플레이트에 각 월당 200㎕씩 가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 시료는 실험직전에 에탄올 또는 DMSO에 용해시켜 3차 종류수로 희석하여 사용하였으며, 대옥시포도필로톡신의 최종 농도는 배양액 1㎖당 5, 4, 2, 1, 0.5, 0.25ng/ml의 6가지 농도로 사용하였다. 96-월 플레이트에 시료 희석액을 10㎕씩 가한 후 37°C, CO₂ 배양기에서 48시간 배양하였다. 시료를 가한 시점에서 Tz(Time zero) 플레이트를 수집하였다. Tz 플레이트 및 배양이 종료된 후 각 플레이트의 배지를 제거하고 10% 트리클로로아세트산(TCA)을 월당 50㎕씩 가하고 4°C에서 1시간 동안 방치하여 세포들을 플레이트의 바닥면에 고정시켰다. 세포의 고정이 완료된 후 플레이트를 물로 5~6회 세척하여 남아있는 TCA 용액을 완전히 제거하고 실온에서 남은 물기가 없도록 건조시켰다. 완전히 건조된 플레이트를 월당 50㎕의 1% 아세트산 용액에 0.4% SRB를 녹인 염색용액을 가하여 30분간 세포를 염색하고 다시 1% 아세트산 용액으로 5~6회 세척하여 세포에 결합하지 않은 SRB를 모두 제거하였다. 이렇게 염색한 후 플레이트를 다시 실온에서 건조시켰다. 여기에 10mM 트리스(Tris) 용액 100㎕를 가해 염료를 용해시켜 마이크로플레이트리더(microplate reader)로 520nm에서 OD(optical density) 값을 측정하였다.

시료의 암세포에 대한 ED₅₀값(암세포의 성장을 50% 억제하는 농도, 50% 유효 농도(effective dose), ng/ml)을 다음과 같이 계산하였다. 시료를 가하여 배양을 시작하는 시간의 OD값을 Tz 값으로, 시료를 처리하지 않고 배양한 월의 OD값을 대조값(C)으로, 시료를 처리하고 배양한 월의 OD값을 실험값(T)으로 각각 정하고, Tz, C 및 T로부터 하기 식에 의해 시료의 세포독성 정도를 측정하였다.

$$\cdot Tz = T \text{인 경우, } (T - Tz) / (C - Tz) \times 100$$

$$\cdot Tz$$

$$(T \text{인 경우, } (T - Tz) / Tz \times 100)$$

상기와 같이 계산된 값들로부터 로터스 프로그램(Lotus program)의 데이터 회귀 기능을 이용하여 시료의 ED₅₀값을 계산하였다.

그 결과 대옥시포도필로톡신의 A524 세포에 대한 ED₅₀값은 0.06ng/ml으로 나타나, 대옥시포도필로톡신이 A524 세포에 대해 우수한 세포독성을 나타낸을 알 수 있었다.

【실시예 3】 대옥시포도필로톡신의 P388 세포에 대한 세포독성 실험

P388 세포는 구형이며 이분법에 의하여 성장하는 세포로서, RPMI 1640 배지에서 1주일에 2회 계대하여 사용하였다. 3차 종류수에 RPMI 1640 분말(Gibco Co.) 1봉(1ℓ 용, 10.5g), FBS(Gibco Co.) 100㎖, NaHCO₃ 1.125g 및 페니실린 100,000단위, 스트렙토마이신 100mg를 가하여 용해시킨 후 0.1N 염산으로 pH를 7.2로 조절하여 전체를 1ℓ가 되게 한 후 세균여과하여 배양액을 제조하였고 4~6°C에서 보관하면서 사

용하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 상태가 유지된 배양기에서 배양하였다.

실험에 사용할 대수 증식기에 도달한 P388 세포를 얻기 위하여 실험 24시간 전에 P388 세포를 2~3× 10⁵ 세포/ml가 되도록 조절한 후 배양시켰다(스피너 컬처(spinner culture)). 이렇게 스피너 컬처한 세포를 세포독성 실험 전에 미리 37°C로 가온한 배지로 희석하여 최종 농도가 5.0× 10⁴ 세포/ml의 농도가 되도록 P388 세포 혼탁액을 만들었다. 시료는 실험직전에 에탄올 또는 DMSO에 용해시켜 3차 종류수로 희석하여 사용하였으며, 데옥시포도필로톡신의 최종 농도는 배양액 1ml 당 5, 4, 2, 1, 0.5, 0.25ng/ml의 6가지 농도로 사용하였다. 24-웰 플레이트에 시료 희석액을 60μl씩 가하고 상기에서 제조한 세포 혼탁액(5× 10⁴ 세포)을 1.5ml씩 가하여 실험군으로 하였고 대조군에는 1.5ml의 혼탁액만을 가하여 37°C, CO₂ 배양기에서 48시간 배양한 후 헐구계를 사용하여 세포수를 계산하였다.

ED₅₀값(ng/ml)은 미국 국립 암연구소, NCI(National Cancer Institute, USA) 매뉴얼의 방법에 의해 결정하였다.

그 결과 데옥시포도필로톡신의 P388 세포에 대한 ED₅₀값은 4.0ng/ml로 나타나, 데옥시포도필로톡신이 P388 세포에 대해 우수한 세포독성을 가짐을 알 수 있다.

데옥시포도필로톡신의 항암제로서의 평가를 위하여 실시예 2 및 3과 같은 시험관내 실험과 더불어 동물 실험이 필수적이므로, 동물실험을 BDF1과 누드(nude) 마우스에 대하여 행하였다.

【실시예 4】 B16F10 세포를 이식한 BDF1 마우스에 대한 항암실험

실험에 사용한 마우스종은 대한 실험동물 센터에서 구입한 BDF1 마우스로 수컷중 체중 18~25g에 속하는 건강한 것을 사용하였다. 사육은 23~24°C로 온도조절이 된 곳에서 물과 먹이를 제한없이 공급하였고 사료는 항생제 무첨가 마우스용을 사용하였다.

C57BL/6 마우스의 피하에 14일간 배양된 마우스의 흑색종 세포주인 B16F10 세포를 함유한 조직을 취한 후 조직 1g당 5ml의 멸균된 냉생리식염수에 가하여 세포혼탁액을 제조하였다. 이 세포혼탁액 0.2ml를 BDF1 마우스의 서혜부에 피하로 이식하였다.

이식후 24시간부터 각 군을 6~7마리로 나눈 후, 시료를 4% 트원(Tween) 80에 용해시킨후 0.01, 1, 5, 10mg/kg(0.0002, 0.02, 0.1, 0.2mg/20g/0.1ml)의 농도로 하여 복강으로 주사하였다. 음성 대조군에는 4% 트원 80만을, 양성 대조군에는 공지의 항암제인 에토포사이드(Etoposide)(10mg/kg)를 주사하였다. 주사 일정은 암이식 24시간 후부터 매일 1회 연속적으로 14~16일 동안 투여하였다.

마우스에 대한 데옥시포도필로톡신의 독성을 측정하기 위해 1주일에 2회 체중을 측정하였으며, 항암효과는 약물투여 14일~16일에 대조군과 실험군의 암의 부피를 측정한 후, 다음과 같이 계산하였다.

- 암의 부피(mm³) = 길이(mm) × 넓이(mm²) / 2
- 암성장 저지율(%) = (C - T) / C × 100
(C: 대조군의 평균 암부피, T: 실험군의 평균 암부피)

그 결과를 표 2에 나타내었다.

【표 2】

B16F10 세포를 이식한 BDF1 마우스에 대한 데옥시포도필로톡신의 암성장 저지 효과(암이식 후 15일 째)

투여량 (mg/kg)	암괴 부피 (mm ³)							평균치± S.E (mm ³)	저지율(%)
0.01	4080	3980	2890	4890	2250	1840	3320	3320± 480	9.5
1	2080	1440	2550	1550	1940	2540	3140	2170± 230	40.9
5	2400	570	0	2710	1190	1970	1530	1480± 370	59.7
10	730	3350	1230	2130	3070	3320	0	2110± 470	42.5
음성 대조군	1890	1920	5560	4790	3600	2380	5550	3670± 620	-
양성 대조 군	3250	2450	820	2230	3160	1220	1420	2078	43.3

(S.E. : 표준편차)

상기 표 2에서 나타낸 바와 같이, 투여량 1mg/kg에서 10mg/kg 범위에서 항암효과가 나타남을 알 수 있다. 특히 1일 5mg/kg 투여량에서 60%의 높은 암성장 저지율을 나타내고 있다. 에토포사이드의 경우 10mg/kg/일의 투여량에서 저지율 43%로 이것은 데옥시포도필로톡신 1mg/kg 또는 10mg/kg의 투여량에 해당된다.

결론적으로 데옥시포도필로톡신이 에토포사이드 보다 B16F10 암에 대하여는 우수한 항암효과를 나타내는

것으로 평가된다.

[실시예 5] 인체 대장암세포주 HT-29 및 인체 폐암세포주 NCI-H23을 이식한 누드 마우스에 대한 항암 실험

실험동물은 미국 할란(Harlan)사의 52주령, 체중 18~20g의 자성 누드 마우스였다. 동물은 무균실에서 1주간 적응시킨 후 사용하였다. 사료는 방사선 멀균처리된 제일제당주식회사 제품을 사용하였고, 물은 고압 멀균하여 투여하였다. 사료와 물은 자유투여시켰다. 인체 대장암 세포주인 HT-29와 인체 폐암세포주인 NCI-H23은 미국립 암연구소로부터 공급받았다. 각 세포주의 농도를 3×10^7 세포/ mL 가 되게 조제하고 마우스당 0.3mL를 피하이식하였다. 데옥시포도필로톡신은 4% 트윈 80에 용해시켜 0.1mg, 0.2mg/20g/0.1mL가 되게 하고 암 이식 24시간 후부터 0.1mL를 1일 1회 계속적으로 복강 주사하였다. 음성 대조군에는 4% 트윈 80만을, 양성 대조군에는 공지의 항암제인 에토포사이드(Etoposide)(10mg/kg 또는 36mg/kg)를 주사하였다. HT-29 암의 경우 15일만에, NCI-H23 암의 경우 19일만에 암괴를 분리하여 무게(mg)를 측정하였다.

그 결과를 표 3과 표 4에 각각 나타내었다.

[표 3]

데옥시포도필로톡신의 HT-29세포를 이식한 누드 마우스에 대한 항암효과

투여량(mg)	1	2	3	4	5	6	평균치±S.E. (mg)	저지율(%)
1.0	73	144	99	189	131	85	120± 17.6	82.2
5.0	41	76	23	101	88	63	65.3± 11.9	90.3
10.0	254	367	269	171	288	412	293± 34.9	56.5
음성 대조군	698	588	619	730	802	620	676± 33.3	-
*양성 대조군	156	320	213	377	197	312	262	61

*에토포사이드 10mg/kg

상기 표 3에 나타낸 바와 같이, 데옥시포도필로톡신은 1mg/kg, 5mg/kg 및 10mg/kg의 농도 모두에서 HT-29 세포를 이식한 누드 마우스 암에 대하여 유효하였다. 5mg/kg와 1mg/kg에서 각각 90%와 82%의 저지율을 나타내었으며 이것은 양성 대조물질인 에토포사이드의 유효투여량 10mg/kg에서의 61% 보다도 강력한 것이다. 10mg/kg 투여량에서는 효력이 감소하고 있음을 알 수 있다.

[표 4]

데옥시포도필로톡신의 NCI-H23세포를 이식한 마우스에 대한 항암효과

투여량(mg)	1	2	3	4	5	6	평균치±S.E. (mg)	저지율(%)
1.0	29	121	99	139	55	189	105± 23.6	61
5.0	63	34	0	21	0	53	28.5± 10.8	89.7
10.0	41	25	89	38	106	88	64± 13.8	75.8
음성 대조군	240	302	335	249	189	327	273± 23.3	-
*양성 대조군	53	133	98	100	64	87	89	68

*에토포사이드 : 36mg/kg/day

상기 표 4에 나타난 바와 같이, 모든 투여량에서 항암성을 보였으며, 특히 투여량 5mg/kg과 10mg/kg에서 각각 89.7%와 75%의 높은 저지율을 보였다. 이는 양성 대조물질로 사용한 에토포사이드 36mg/kg에서의 68%보다 강력한 것이다.

결론적으로 데옥시포도필로톡신은 대다수 항암제에 대하여 저항적인 마우스 B16F10 측색종에 대하여 60%의 암성장 저지율을 보일 뿐만 아니라, 인체 폐암세포 및 대장암세포를 이식한 누드 마우스 암의 성장 저지율도 에토포사이드 보다 높았다.

한편 데옥시포도필로톡신의 경우, 전통 한방에서 전호를 통상 1일 10g까지 사용하고 있으므로, 일상 용량에서는 독성이 없음을 알 수 있다.

[제제예]

폴리에틸렌글리콜 300 650mg, 에틸알콜 30.5%(v/v), 폴리소르베이트 80 80mg, 벤질알콜 30mg, 시트르산 2.0mg을 혼합하여 혼합용액 1mL를 제조하였다. 여기에 데옥시포도필로톡신 10mg, 20mg 및 30mg를 용해시켜 제제 1, 2 및 3을 각각 제조하고 120°C에서 30분간 멸균하였다. 사용시에는 약물 10mg당 생리식염수, 포도당용액을 2~5mL 가하여 희석한 후 사용하였다.

발명의 효과

본 발명에 따른 데옥시포도필로톡신을 유효성분으로 함유하는 혈관 신생 억제제 조성물 및 혈관 신생 억제방법은 혈관 신생을 효과적으로 억제하는 효과를 갖고 나아가 항임제로 유용하게 사용될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

데옥시포도필로톡신을 유효성분으로 함유하는 고형암 치료제 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 데옥시포도필로톡신은 전호(*Anthriscus sylvestris*)로부터 분리되는 것인 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 데옥시포도필로톡신이 60 ~ 300mg/일로 투여되도록 하는 조성물.

청구항 4

데옥시포도필로톡신을 투여하는 단계를 포함하는, 인간을 제외한 동물의 혈관 신생 억제에 의한 고형암 치료 방법.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 데옥시포도필로톡신은 전호(*Anthriscus sylvestris*)로부터 분리되는 것인 방법.

청구항 6

제 4 항에 있어서, 데옥시포도필로톡신을 60 ~ 300mg/일로 투여하는 단계를 포함하는 방법.

도면

도면1

